

**Bibliographic Information**

**Preparation of 26S rat liver proteasome.** Niihara, Naoki; Tanaka, Keiji. (Bio Material Kenkyusho Kk, Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho (1994), 13 pp. CODEN: JKXXAF JP 06022759 A2 19940201 Heisei. Patent written in Japanese. Application: JP 92-199028 19920703. CAN 121:3947 AN 1994:403947 CAPLUS (Copyright 2003 ACS on SciFinder (R))

**Patent Family Information**

<u>Patent No.</u>	<u>Kind</u>	<u>Date</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
JP 06022759	A2	19940201	JP 1992-199028	19920703

Priority Application

JP 1992-199028 19920703

**Abstract**

Isolation of 26S rat liver proteasome capable of degrading ubiquitin-binding protein in the presence of ATP is described. It is composed of a 21-31-kDa 20S proteasome and a group of 35-110-kDa regulatory proteins. It exhibits a pH optimum 7.0-8.5 and a temp. optimum 35-45°, when using acidic amino acids as substrates. The prepn. method comprises using glycerin, 2-mercaptoethanol or dithiothreitol, and ATP. The proteasome is useful in clin. diagnosis of, e.g., cancer.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-22759

(43)公開日 平成6年(1994)2月1日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 9/64	Z 9161-4B			
// A 61 B 10/00	T			
A 61 K 37/54	AAM			
	ADU 8314-4C			
G 01 N 33/53	D 8310-2J			

審査請求 未請求 請求項の数3(全13頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-199028

(22)出願日 平成4年(1992)7月3日

(71)出願人 591082269

株式会社バイオマテリアル研究所  
神奈川県横浜市栄区田谷町1番地

(72)発明者 新原 直樹  
神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 株式会  
社バイオマテリアル研究所内

(72)発明者 田中 啓二  
徳島県徳島市下町本丁206番地

(74)代理人 弁理士 須藤 政彦

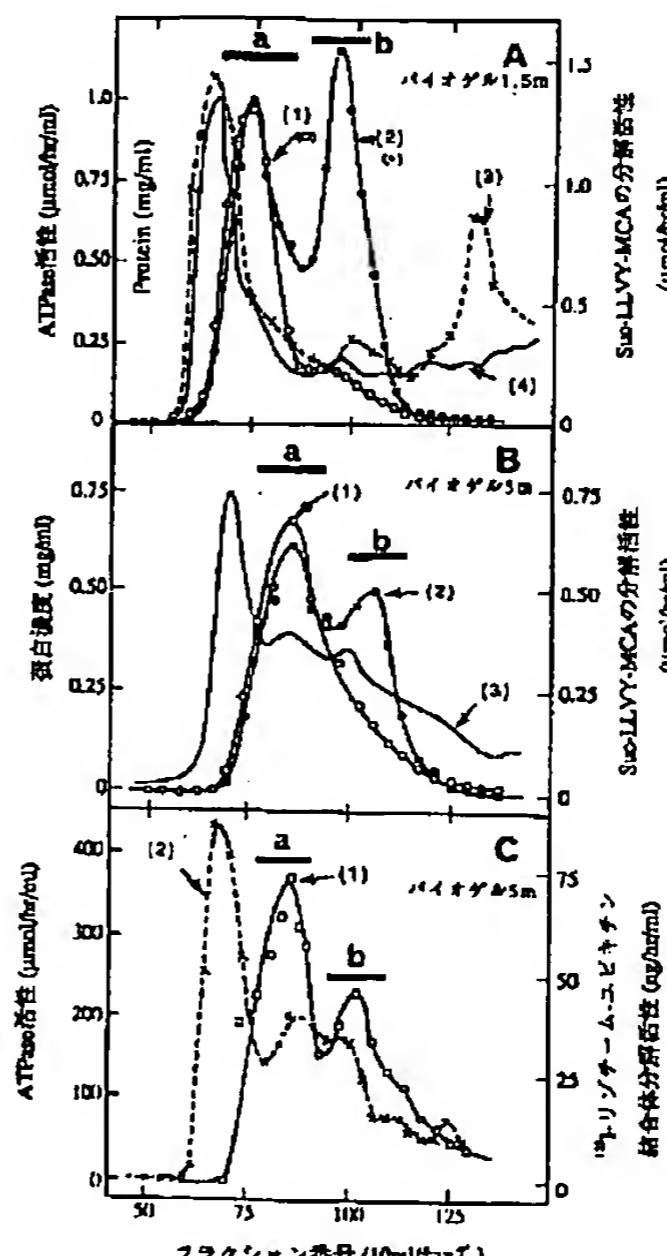
(54)【発明の名称】 ラット26Sプロテアソームおよびその製造方法

(57)【要約】

【目的】 ラット26Sプロテアソームおよびその製造方法を提供する。

【構成】 ユビキチン結合蛋白質を分解する細胞内多機能プロテアーゼであるラット26Sプロテアソーム。当該ラット26Sプロテアソームは、ラット肝臓細胞などの細胞質画分から、ATPを添加した特定の分離溶媒を用いた物理化学的分離方法により、精製、単離することによって製造される。

【効果】 ユビキチン化した蛋白質を解する作用を有し、各種癌をはじめとする各種病態のメカニズムの解明、診断および治療などに有用である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】下記の酵素学的および物理学的性質を有するラット26Sプロテアソーム。

(1) ユビキチンが結合した蛋白質を、ATP存在下で分解する活性を有する

(2) ATPを分解する活性を有する

(3) 超遠心法で測定した沈降係数は、26Sである

(4) 分子量は、約2,000kDa(キロダルトン)であり、21-31kDaの20Sプロテアソームと、それ以外の分子量35-110kDaの制御因子蛋白質群より構成される

(5) 電子顕微鏡で観察した分子形状は、ダンベル状で、その中央部に20Sプロテアソームの構造が認められる

(6) 中性アミノ酸である合成基質Suc-LLVY-MCA(サクシニル-ロイシル-ロイシル-バリル-チロシン-4-メチル-クマリル-7-アミド)を分解する酵素活性を有し、その至適pHは、7.5-9.0である

(7) 酸性アミノ酸であるCbz-LLE-NA(カルボベンゾキシル-ロイシル-ロイシル-グルタミン酸-2-ナフチルアミド)を分解する酵素活性を有し、その至適pHは、7.0-8.5であり、至適温度は、35°C-45°C、至適SDS添加濃度は、0.05%である

(8) 塩基性アミノ酸であるBoc-LRR-MCA(t-ブチルオキシカルボニル-ロイシル-アルギニル-アルギニン-4-メチル-クマリル-7-アミド)を分解する酵素活性を有し、その至適pHは、7.5-9.0であり、至適温度は、30°C-45°Cである

【請求項2】ラット臓器、細胞の細胞質画分により、物理化学的分離方法により、安定、かつ高収率で精製されたラット26Sプロテアソームを製造する方法において、当該物理化学的分離方法が、超遠心、ゲル通過カラム、ハイドロキシアバタイトカラム、グリセロール密度勾配遠心から選択される1種以上を用いたものであることを特徴とする前記請求項1に記載されたラット26Sプロテアソームの製造方法。

【請求項3】ラットの臓器、細胞の細胞質画分により、物理化学的分離方法により、安定、かつ高収率で精製されたラット26Sプロテアソームを製造する方法において、グリセリン、2-メルカプトエタノールあるいはジチオスレイトール、およびATPを添加した分離溶媒を用いた物理化学的分離方法により、精製することを特徴とする前記請求項2に記載されたラット26Sプロテアソームの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ラット26Sプロテアソームに関するものであり、さらに詳しくは、ATP依存的にユビキチン結合蛋白質を分解する新規な細胞内多

機能プロテアーゼおよびその製造方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】細胞内で不要あるいは異常な蛋白質が分解される機構として、ユビキチン依存的分解経路が知られている[Rechsteiner M. ed., 「Ubiquitin」 Plenum, New York (1988)]。ユビキチンは、分子量約8、500の蛋白質で、真核生物の細胞に普遍的に存在し、種々の蛋白質にイソペプチド結合し、分解のための目印となる。このユビキチンによる蛋白質の修飾および分解には、ATPをエネルギー源として必要とすることがわかっている。

【0003】このようなユビキチン化した蛋白質を分解する機構が解明できれば、細胞内における不必要的蛋白質、あるいは異常な蛋白質の動態を把握することが可能となり、さらに各種癌をはじめとする各種病態の診断、および治療法を確立する上で、きわめて有益である。しかしながら、このユビキチン化した蛋白質を分解する酵素の実体については明らかになっていないことから、当該、ユビキチン化した蛋白質を分解する機構の詳細を解明することが強く要請されていた。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明者等は、このような状況を踏まえ、これまで、構造が解明されていないユビキチン化した蛋白質を分解する酵素の詳細を明らかにすると共に、各種癌をはじめとする各種病態の診断、および治療法を確立することを目標として鋭意研究を積み重ねた結果、当該酵素として、ユビキチン化した蛋白質を分解する細胞内多機能プロテアーゼである新規なラット26Sプロテアソームを精製し、単離すると共に、その詳細について解明することに成功して、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明は、ユビキチン化した蛋白質を分解する細胞内多機能プロテアーゼである新規なラット26Sプロテアソームを提供することを目的とするものである。

【0006】また、本発明は、当該酵素を安定、かつ高収率で製造する方法を提供することを目的とするものである。

【0007】また、本発明は、ラット26Sプロテアソームの酵素学的および物理学的性質などの詳細を明らかにすることにより、当該酵素の機能の解明に役立つのみならず、各種癌をはじめとする各種病態の診断、および治療法として有用な新しい技術を提供することを目的とするものである。

【0008】さらに、本発明は、ラット26Sプロテアソームを抗原として調製される抗体を利用することにより、各種癌をはじめとする各種病態の免疫測定法による診断技術を提供することを目的とするものである。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】このような目的を達成するための本発明の構成は、以下の1～3よりなるものである。

1 下記の酵素学的および物理学的性質を有するラット26Sプロテアソーム。

(1) ユビキチンが結合した蛋白質を、ATP存在下で分解する活性を有する

(2) ATPを分解する活性を有する

(3) 超遠心法で測定した沈降係数は、26Sである

(4) 分子量は、約2,000kDa(キロダルトン)であり、21～31kDaの20Sプロテアソームと、それ以外の分子量35～110kDaの制御因子蛋白質群より構成される

(5) 電子顕微鏡で観察した分子形状は、ダンベル状で、その中央部に20Sプロテアソームの構造が認められる

(6) 中性アミノ酸である合成基質Suc-LLVY-MCA(サクシニル-ロイシル-ロイシル-バリル-チロシン-4-メチル-クマリル-7-アミド)を分解する酵素活性を有し、その至適pHは、7.5～9.0である

(7) 酸性アミノ酸であるCbz-LLE-NA(カルボベンゾキシル-ロイシル-ロイシル-グルタミン酸-2-ナフチルアミド)を分解する酵素活性を有し、その至適pHは、7.0～8.5であり、至適温度は、35℃～45℃、至適SDS添加濃度は、0.05%である

(8) 塩基性アミノ酸であるBoc-LRR-MCA(t-ブチルオキシカルボニル-ロイシル-アルギニル-アルギニン-4-メチル-クマリル-7-アミド)を分解する酵素活性を有し、その至適pHは、7.5～9.0であり、至適温度は、30℃～45℃である

【0010】2 ラット臓器、細胞の細胞質画分により、物理化学的分離方法により、安定、かつ高収率で精製されたラット26Sプロテアソームを製造する方法において、当該物理化学的分離方法が、超遠心、ゲル濾過カラム、ハイドロキシアバタイトカラム、グリセロール密度勾配遠心から選択される1種以上を用いたものであることを特徴とする前記1に記載されたラット26Sプロテアソームの製造方法。

【0011】3 ラットの臓器、細胞の細胞質画分により、物理化学的分離方法により、安定、かつ高収率で精製されたラット26Sプロテアソームを製造する方法において、グリセリン、2-メルカプトエタノールあるいはジチオスレイトール、およびATPを添加した分離溶媒を用いた物理化学的分離方法により、精製することを特徴とする前記2に記載されたラット26Sプロテアソームの製造方法。

【0012】続いて、本発明についてさらに、詳細に説明する。本発明者等は、これまで、構造が解明されてい

ないユビキチン化した蛋白質を分解する酵素の詳細を明らかにすることを目標とし、鋭意研究を重ねてきた。その結果、本発明により、当該酵素は、既に本発明者等が報告した20Sプロテアソーム(多機能プロテアーゼ、分子量約750kDa)(Tanaka K., et al., 「J. Mol. Biol.」 203, 985～996(1988))と、未知機能をもった制御因子が結合した巨大な複合体であることがわかり、本発明者等は、26Sプロテアソーム(分子量約2,000kDa)と命名した。

【0013】20Sプロテアソームは、同一分子内に複数の触媒活性をもつ多成分複合体プロテアーゼであり、また酸性、塩基性、中性のアミノ酸を分解する多機能性プロテアーゼでもあるが、ユビキチン化した蛋白質を分解する活性はなかった。

【0014】従って、本発明の26Sプロテアソームは、プロテアーゼとしての20Sプロテアソームが、制御因子と結合することにより、ユビキチン化した蛋白質を識別して、分解するという新しい機能を獲得しているものであることがわかった。また、当該酵素の新しい機能として、ATPase活性をもつことが明らかになった。さらに、当該酵素は、20Sプロテアソームと同様に、酸性、塩基性、中性のアミノ酸を分解する活性をもっていたが、アミノ酸分解における至適SDS濃度、至適pH、至適温度は、20Sプロテアソームと異なることが明らかになった。

【0015】このような新しい知見を基礎として、本発明のラット26Sプロテアソームは、これを用いることにより、当該酵素の機能の解明に役立つのみならず、各種癌をはじめとする各種病態の診断、および治療法として役立つ技術を確立する上で有用なものである。

【0016】このように、26Sプロテアソームの主要な機能は、ユビキチンが結合した蛋白質を分解する活性をもつことであるが、最近、癌遺伝子産物や、細胞周期関連遺伝子産物が、このユビキチン依存性の分解経路で分解されることが報告され注目されている。

【0017】これら遺伝子産物の蛋白質の例としては、c-myc癌遺伝子産物、p53癌抑制遺伝子産物((Schaffner M., et al., 「Cell」 63, 1129～1136(1990)), cdc2キナーゼ調節蛋白質であるサイクリン(Cdktz M., et al., 「Nature」 349, 132～138(1991))などが挙げられる。

【0018】従って、本発明のラット26Sプロテアソームは、癌化のメカニズムの解明や、癌の治療、および診断に有用である。

【0019】また、アルツハイマー病患者の脳内には、ユビキチン化した蛋白質が異常蓄積しており、少なくとも、この疾患の原因の一つに細胞内における蛋白質分解系の異常があることが示唆された。従って、本発明のラ

ット26Sプロテアソームは、アルツハイマー病のメカニズムの解明や、アルツハイマー病の治療、および診断に有用である。

【0020】このように、本発明の26Sプロテアソームを用いた各種病態の診断法、および治療法の開発は、これらの病態と本酵素との係わりを、ヒトにおける各種病態の治療法および/または診断法の開発に直結する意味で有用である。かかる測定には、例えば通常の免疫測定法が使用でき、本発明の26Sプロテアソームは、当該測定に使用する抗体の抗原として好適に使用される。

【0021】すなわち、本発明のラット26Sプロテアソームを抗原として常法によりモノクローナル抗体を作製し、当該モノクローナル抗体を有効成分として各種病態を測定し、診断するための免疫測定用診断剤を製造することができる。当該診断剤としては、肝癌、腎癌、白血病などの悪性腫瘍の診断剤などが好適なものとして例示される。

【0022】次に、本発明ラット26Sプロテアソームの特性を有する蛋白質を得る製造方法について、詳述すると、以下の通りである。本発明ラット26Sプロテアソームは、ラットの種々の組織、器官、産生細胞から、より具体的には、ラット腎臓、肝臓、心臓、脳、肺、胸腺、などの各種臓器、およびラット肝癌細胞株、ラット腎臓細胞株などの樹立細胞株の細胞質画分より得ることができる。

【0023】上記の細胞質画分の調製は、通常の細胞質画分法によることができる。例えば、上記記載の細胞をホモジネートし、遠心分離することにより、細胞膜、核、ミトコンドリア、リソゾームおよびミクロソームの分画を除き、その上清を細胞質画分として使用できる。

【0024】かかる細胞質画分からの本発明ラット26Sプロテアソームの分離、精製は、当該酵素の酵素化学的、物理化学的性質等を利用した各種の処理操作により実施することができる。例えば、これらの分離、精製方法としては、透析法、限外濾過法、ゲル濾過法などの主として分子量の差を利用する方法、イオンクロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点を利用する方法などが挙げられる。

【0025】しかしながら、ATP依存的にユビキチン結合蛋白質を分解する26Sプロテアソームの分離、精製は、既に本発明者等が報告した20Sプロテアソームに比較して、非常に難しい。その理由として、(1) 26Sプロテアソームは、20Sプロテアソームに比較して非常に不安定である、(2) 26Sプロテアソームの活性を検出するためのアッセイ系の確立が容易でないことがあげられる。

【0026】かかる課題を解決するために、鋭意検討を重ねた結果、(1) の課題に対しては26S型プロテア

ソームを安定化させる条件として、グリセリン、2-メルカプトエタノールあるいはジチオスレイトール、そしてATP、を分離溶媒中に添加しておくことにより、安定化させることができることがわかった。

【0027】しかしながら、蛋白質の高次構造に影響する処理、クロマトグラフィーを繰り返すと、26Sプロテアソームは、その構成要素に不可逆的に解離した。そこで、このような知見を基礎として、本発明者等は、主として、分子サイズの違いによる分離を基本戦略として、必要に応じて最小限のクロマトグラフィーを操作を行なう分離、精製方法を開発するに至った。

【0028】即ち、ラット26Sプロテアソームの製造方法として、(1) 超遠心法により得た細胞質画分を、(2) バイオゲルカラム1.5mカラム、(3) バイオゲル5mカラム、(4) ハイドロキシアバタイトカラム、(5) グリセロール密度勾配遠心により分離、精製する方法を開発するに至った。

【0029】本発明のラット26Sプロテアソームの精製方法の特徴は、26Sプロテアソームを、できるだけカラムに吸着させないで精製することにより、蛋白質の解離を防ぐことがある。即ち、(2)、(3)のバイオゲルカラムでは、26Sプロテアソームはそれぞれ、分子篩により溶出された。また、(4)のハイドロキシアバタイトカラムでは、溶出液中のATPの濃度を2mMから5mMにすることにより、20Sプロテアソームはカラムに吸着するが、26Sプロテアソームはカラムに吸着せずに溶出された。さらに、26Sプロテアソームが吸着するQ-セファロースカラム等の電荷の差による精製を省いた。

【0030】これらの改良により、26Sプロテアソームがカラムに吸着することによる解離を防ぎ、簡便に収率よく26Sプロテアソームを精製する方法を開発するに至った。

【0031】次に、(1)の課題に対しては、26Sプロテアソームの鋭敏なアッセイ法を開発した。一つはユビキチン結合蛋白質分解活性の測定に供する基質蛋白質を安定に確保することにより、酵素活性を定量的に測定することが可能になった。即ち、本発明者等は、ユビキチン依存性蛋白質分解系のよい基質となる<sup>125</sup>I-リゾチームとユビキチンを効率よく結合させる方法を開発した〔(Tamu-ra T., et al., 「FEBS Lett.」292, 154-158 (1991)]。

【0032】また、本発明者等は、Suc-LLVY-MCAの分解に対して、20Sプロテアソームは、不活性型であるが、26Sプロテアソームは活性型であることを見いだし、Suc-LLVY-MCAの分解活性を調べることにより、26Sプロテアソームを簡便に検知する方法を開発した。従って、この簡便なアッセイ法と、上記記載の、より定量性の優れた<sup>125</sup>I-リゾチ

ム-ユビキチン結合蛋白質の分解活性を調べることにより、26Sプロテアソーム精製の指標にした。

【0033】上記、分離、精製操作により、得られた本発明ラット26Sプロテアソームは、前記した酵素学的および物理化学的性質により特定される新規なものである。

【0034】なお、本明細書および図面において、試薬や分析法などを略号で表示する場合は、IUPAC-IUBによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものを用いており、その例を次に挙げる。

【0035】Suc-LLVY-MCA；サクシニル-ロイシル-ロイシル-バリル-チロシン-4-メチルクマリル-7-アミド(Succinyl-Leucyl-L-leucyl-Va1y1-Tyrosine-4-Methyl-Courom-aryl-7-Amide)

【0036】Cbz-LLE-NA；カルボベンゾキシル-ロイシル-ロイシル-グルタミン酸-β-ナフチルアミド(Carbobenzoxyl-Leucyl-Leucyl-Glutamic acid-β-Naphthylamide)

【0037】Boc-LRR-MCA；t-ブチルオキシカルボニル-ロイシル-アルギニル-アルギニン-4-メチル-クマリル-7-アミド(t-Butyloxycarbonyl-Leucyl-Arginyl-Arginine-4-Methyl-Courom-aryl-7-Amide)

【0038】SDS-ドデシル硫酸ナトリウム(Sodium Dodecyl Sulphate)

【0039】PAGE ポリアクリルアミド電気泳動(Polyacrylamide gel electrophoresis)

【0040】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

ラット26Sプロテアソームの精製におけるアッセイ法  
(1) ユビキチン化蛋白質の分解活性

<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合体は、本発明者等の方法(Tamura T., et al., 「FEBS Lett.」292, 154-158 (1991)]に従い、<sup>125</sup>I-リゾチームとユビキチンをユビキチン結合酵素系(E1、E2、E3)を用いて結合した。次いで、<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合体(5,000-10,000cpm)と、26Sプロテアソーム(あるいは精製過程でのカラムフラクション)を、50mM Tris-HCl(pH7.5)、5mM MgCl<sub>2</sub>、2mM ATP、1mMジチオスレイトール中(最終体積で100μlになるようにする)で、37℃60-120分間、インキュベートした。反応後の<sup>125</sup>

I-リゾチームとユビキチン結合体の分解を調べるために、575μlの10%トリフルオロ酢酸と125μlの4%牛血清アルブミン(キャリア蛋白質)を添加して、酸可溶性画分をγ-カウンターで測定した。

【0041】(2) 合成ペプチドの分解活性

ペプチド合成基質としては、中性アミノ酸であるSuc-LLVY-MCA、塩基性アミノ酸であるBoc-LRR-MCA(ペプチド研究所社製)、および酸性アミノ酸であるCbz-LLE-NA(シグマ社製)のいずれかを用い、26Sプロテアソーム(あるいは精製過程でのカラムフラクション)と、0.05%SDS存在下あるいは、非存在下において、100mM Tris-HCl(pH8.0)中、37℃で、10-30分間インキュベートした。反応は、100μlの10% SDSと2mlの0.1M Tris-HCl(pH9.0)を添加し停止させ、反応後の溶液の蛍光を測定し、分解活性を測定した。

【0042】(3) ATPase活性の測定

50mM Tris-HCl(pH7.5), 5-15μlの精製過程でのカラムフラクションあるいは26Sプロテアソーム(1-2μg)、1mMジチオスレイトール、5mM MgCl<sub>2</sub>、および0.5μCi[2,8-<sup>3</sup>H]ATPを混合し(総体積25μl), 37℃で60分間反応させた。反応は、0.1M ATP, ADP、およびAMPと3μlの10%SDSを添加することにより停止させた。

【0043】反応液2μlを、0.5M LiClを含む1M辛酸中において、PEI(ポリエチレンイミン)セルロースF-TLCプラスチックシート(エルク社)上で展開し、生じたADPを分離した。<sup>[3]</sup>H]ATPから<sup>[3]</sup>H]ADPへの変換は、Armon等の方法(Armon et al., 「J. Biol. Chem.」265, 20723-20725 (1990)]により、測定した。

【0044】実施例2

ラット26Sプロテアソームの製造

ラット26Sプロテアソームの製造は全て、4℃の条件下で行ない、特に述べないかぎり標準液である25mM Tris-HCl(pH7.5)、1mMジチオスレイトール、2mM ATP、20%グリセロールを用いて、以下の順序に従い行なった。

【0045】(1) 超遠心法による精製

ウイスターラット(雄)の肝臓を摘出し、総重量500g分の肝臓を、その約3倍体積量の50mM Tris-HCl(pH7.5)、1mMジチオスレイトール、2mM ATP、0.25Mスクロース中で、Pott er-E1-vehjemのホモジナイザーを用いてホモジナイズした。得られたホモジネートは、30,000rpm(日立RP42ロータ、平均70,100xg)で1時間超遠心し、得られた上清約3-4gを出

発物質とした。

【0046】この上清を70, 100×gで5時間遠心し、得られた26Sプロテアソームを含む沈殿を約50m1の標準液に溶かした。さらに、不溶物を除去するために、20, 000×gで30分間遠心した。この超遠心法による精製により、約1.5gの蛋白質が回収され、ATP依存的に<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合体を分解する活性は、4.3ng/h/mgであった。なお、この活性は、クルードな状態でも、-70℃で、数ヶ月間安定であった。

【0047】(2)バイオゲルA-1.5mとA-5m分子篩クロマトグラフィーによる精製  
超遠心法で得たサンプル約500-600mgを、バイオゲルA-1.5mカラム(5×100cm、バイオラッド社製)にアプライし、標準液を用いて60ml/hrの速度で溶出した。各フラクションは10mlずつ集め、その酵素活性を測定した。図1Aに得られたクロマトグラフィーの溶出パターンを示す。図1Aにおいて、横軸はフラクション番号を、縦軸はSuc-LLVY-MCAを分解する活性(曲線(1))、0.05%SDS存在下でSuc-LLVY-MCAを分解する活性(曲線(2))、ATPase活性(曲線(3))、蛋白質濃度(曲線(4))を示す。

【0048】図1Aで、バーa(フラクション番号75付近)、バーb(フラクション番号100付近)のフラクション画分を比較すると、a画分は、0.05%SDSが存在しなくてもSuc-LLVY-MCAを分解する活性があるが、b画分は、0.05%SDSが存在してはじめてSuc-LLVY-MCAを分解する活性が現われた。

【0049】また、この図中には示していないが、a画分には、<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合体を分解する活性があるが、b画分にはなく、さらにa、b両画分中には、ウェスタンプロティングの結果から、プロテアソームのコンポーネントが含まれることがわかった。これらのことより、a画分は、26Sプロテアソームであり、b画分は、20Sプロテアソームであることがわかった。

【0050】そこで、バーaで示した26S画分(蛋白質量で90-120mg)をプールして、次の精製に移った。26Sプロテアソームは、バイオゲルA-1.5mカラムでは、ボイドボリュームに近接して溶出するため、他の蛋白質が混入していた。そこで、夾雜蛋白質を除去するために、バイオゲルA-1.5mカラムによる精製でプールした26S画分(約300mg)をアミコンPM-10メンブランにより、約50mlに濃縮し、バイオゲルA-5mカラム(5×100cm、バイオラッド社製)にバイオゲルA-1.5mカラムの際と同条件でアプライした。

【0051】図1Bに、得られたクロマトグラムのバタ

ーンを示す。図1Bにおいて、横軸はフラクション番号を、縦軸はSuc-LLVY-MCAを分解する活性(曲線(1))、0.05%SDS存在下でSuc-LLVY-MCAを分解する活性(曲線(2))、蛋白質濃度(曲線(3))を示す。図1Bにおいて、夾雜する蛋白質は、ボイドボリュームに溶出され(曲線(3))、SDS非存在下でも、Suc-LLVY-MCAを分解する26Sプロテアソームの活性(曲線(1))が、フラクション番号78付近のa画分にみられた。

【0052】図1Cに、図1Bと同様のフラクションにおけるATPase活性と<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合体を分解する活性を示す。図1Cにおいて横軸はフラクション番号を、縦軸は<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合体を分解する活性(曲線(1))およびATPase活性(曲線(2))を示す。図1Cから、バーaで示される画分には、<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合体を分解する高い活性がみられた。また、この画分には、ATPase活性もみられた。そこで、この画分(約100mg)をプールして次の精製に移った。

【0053】(3)ハイドロキシアパタイトカラムによる精製

バイオゲルA-5mカラムで得られた26Sプロテアソーム画分に、ATPを最終濃度5mMになるように添加した。このサンプル約100mgを、10mMリン酸緩衝液(pH6.8)、1mMジチオスレイトール、5mM ATP、20%グリセロールで平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(ベッドボリューム；55ml)にアプライした。

【0054】26Sプロテアソームは、5mM ATP存在下では、カラムに吸着せずに溶出されたが、20Sプロテアソームを含む約70%の蛋白質はカラムに吸着した。カラムは1ベッド体積の上記緩衝液で洗浄し、非吸着画分として集めた。こうして、約30mgの26Sプロテアソーム蛋白質が得られた。

【0055】(4)グリセロール密度勾配遠心法による精製

ハイドロキシアパタイトカラムによる精製で得られた26Sプロテアソーム画分をアミコンPM-10メンブランを用いた限外濾過により2.0mg/mlに濃縮し、グリセロール密度勾配遠心法による精製を行なった。

【0056】図2に、その結果を示す。図2において横軸はフラクション番号を、Aの縦軸はSuc-LLVY-MCAを分解する活性(曲線(1))、0.05%SDS存在下でSuc-LLVY-MCAを分解する活性(曲線(2))、蛋白質濃度(曲線(3))を示し、Bの縦軸は、<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合体を分解する活性(曲線(4))およびATPase活性(曲線(5))を示す。0.05%のSDS存在下あるいは、非存在下でもSuc-LLVY-MCAを分解する

11

活性が、バーaで示したフラクション番号12-16付近にみられた。さらに、この画分には、<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合体を分解する活性およびATPase活性がみられた。

【0057】最終的に、このフラクション番号12-16の画分を集めることにより、26Sプロテアソームを精製するに至った。その蛋白質量を測定すると、約550μgであり、その酵素活性を示すと以下の様になった。<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合体の分解活性；418 pg/hr/μg、ATPase活性；2.1nmol/hr/μg、Suc-LLVY-MCAの分解活性；30.5pmol/min/μg。また、この精製26Sプロテアソームの沈降係数を超遠心法で測定したところ約26Sであった。また、この値と拡散係数から、求めた分子量は約2,000kDaであった。

#### 【0058】実施例3

ラット26Sプロテアソームの電気泳動による構造解析

##### (1) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動による解析

実施例2(4)で精製したラット26Sプロテアソームの分子構造を明らかにするために、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)により解析した。ラット26Sプロテアソームを1%SDSで変性後、Laemmli等の方法[Laemmli, U.K., 「Nature」227, 680-685(1970)]による10-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、銀染色を行なった。その結果を、図3に示す。また、同様にして、精製したヒト腎臓26Sプロテアソームおよびラットおよびヒトのそれぞれの20Sプロテアソームの電気泳動の結果もあわせて示す。

【0059】図3Aに示す様に、ラットおよびヒトの20Sプロテアソームの分子量は、既に本発明者等が報告した様に、21-31kDaであった。一方、26Sプロテアソームについては、図3Bに示す様に、ラットおよびヒトで、ともに21-110kDaのバンドが確認された。ラットとヒトでは電気泳動上のパターンは図中、矢印で示した箇所が異なっていたが、他はほとんど一致していた。従って、ラット26Sプロテアソームは、ヒトと同様に、21-31kDaの20Sプロテアソームと35-110kDaの制御因子蛋白質群より構成される巨大な複合体蛋白質であることがわかった。

【0060】次に、ラット26Sプロテアソーム中にジスフィルド結合が存在するかどうかを調べるために、2-メルカプトエタノール存在下で電気泳動を行なったところ(図6B、+ME)、非存在下の場合(-ME)と比較して変わらなかった。このことより、ラット26Sプロテアソーム複合体中には、ジスフィルド結合が存在しないことがわかった。

12

#### 【0061】(2) 2次元電気泳動による解析

26Sプロテアソームの分子構造をさらに明らかにするために、1次元目に等電点電気泳動、2次元目にSDS-PAGE(12.5%のゲル濃度)を行なう2次元電気泳動を、O'Farrellの方法[O'Farrell P.H., 「J. B. Chem.」250, 4007-4021(1975)]で行ない、銀染色した。その結果を図4に示す。

【0062】図4において、横軸は、等電点マーカーで、縦軸は分子量マーカーを示す。図4では、等電点3-10、分子量21-31kDaに15-20個のバンド(囲みB)と等電点4.0-6.5、分子量35-110kDaに15-25個のバンド(囲みA)が見られた。Bの15-20個の成分は、本発明者等が、すでに報告した20Sプロテアソームの構成成分であり、一方、Aの15-20個の成分は、20Sプロテアソームに結合する制御因子蛋白質群であった。

#### 【0063】(3) 未変性状態でのポリアクリルアミド電気泳動

26Sプロテアソームの分子構造をさらに明らかにするために、未変性状態でポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)を行なった。その結果を図5に示す。ポリアクリルアミドゲルの濃度は、3%(A)、4%(B)、5%(C)で比較し、サンプルとしては、精製した20Sプロテアソーム(20S)を10μg、肝臓のホモジネートを超遠心して得たクルードなエクストラクト(CE)を200μg、および精製した26Sプロテアソーム(26S)を3.5μgを用い、それぞれのゲルで比較した。

【0064】3%および4%のゲルでは、26Sプロテアソームは、同様の挙動を示し、2つのアイソフォーム26Sαと26Sβの存在が確認されたが、5%ゲルでは、確認できなかった。一方、20Sプロテアソームは、すべてのゲル濃度で確認でき、ポリアクリルアミド濃度に電気泳動上の移動度が依存していた。さらに、クルードなエクストラクトにおいてみられる26Sα、26Sβ、および20Sプロテアソームのバンドは、それぞれ精製して得られたバンドの位置に一致していた。このことは、実施例2の(4)で精製して得られた26Sプロテアソームには、2つのアイソフォームが存在することを示している。

【0065】さらに、この二つのアイソフォームを電気泳動で調べたところ、26Sα、26Sβプロテアソームは、ともに同じ分子量の20Sプロテアソームと35-150kDaの制御因子から構成されていることがわかった。このことより、この2つのアイソフォームが生じたのは、分子量サイズによるものではなく、荷電状態の違う2種類の26Sプロテアソームが存在しているためであることがわかった。

#### 50 【0066】実施例4

13

ラット26SプロテアソームのATPase活性とユビキチン結合蛋白質の分解活性

実施例2の(4)で精製したラット26SプロテアソームのATPase活性および<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合体分解活性のpH依存性とATP依存性を調べた。pH依存性の結果を図6Aに、ATP濃度依存性の結果を図6Bに示す。図6Aより、26SプロテアソームのATPase活性とユビキチン結合蛋白質分解活性は、pH8-9にピークがあったことより、該酵素の至適pHは8-9であることがわかった。

【0067】また、図6Bより、26SプロテアソームのATP分解のKm値は、約0.25mMであることがわかった。これらの結果より、精製26SプロテアソームはATP存在下でユビキチン結合蛋白質を分解する活\*

14

\*性があり、その至適pHは、8-9、Km値は、0.25mMであることがわかった。

#### 【0068】実施例5

ラット26SプロテアソームのATPase活性  
実施例2の(4)で精製したラット26SプロテアソームのATPase活性について、ATPaseの阻害剤等を用いて調べた。その結果を表1に示す。表1には、ユビキチン結合蛋白質、およびATP分解活性に及ぼす各種阻害剤の添加効果について、すなわち、添加した化合物の最終濃度におけるATPase活性、および<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合体分解活性の無添加コントロールに対する相対活性(%)を示す。

#### 【0069】

#### 【表1】

化合物	最終濃度	<sup>125</sup> I-リゾチーム-ユビキチン	
		ATPase活性	結合体分解活性
相対活性(%)			
N-Ethylmaleimide	5mM	17	24
Hemin	100 μM	36	0
Leupeptin	50 μg/ml	72	100
Chymostatin	50 μg/ml	87	82
EP-475	50 μg/ml	108	100
Cystatin	10 μM	189	100
NaN <sub>3</sub>	10mM	64	100
Vanavate(VO <sub>3</sub> form)	100 μM	34	31
Quercetin	500 μM	30	15

【0070】ATPase阻害剤であるヴァナディトとクウエルセチンは、26SプロテアソームのATPase活性を阻害するとともに、<sup>125</sup>I-リゾチーム-ユビキチン結合体分解活性も大きく阻害（コントロールの35%以下）した。また、N-エチルマレイミドとヘミンもこれらの活性をATPase阻害剤と同様に阻害した。しかしながら、プロテアーゼインヒビターとして知られているロイペプチド、キモスタチン、EP-475はこれらの活性を阻害しなかった。

【0071】これらの結果より、26SプロテアソームのATP分解活性とユビキチン化蛋白質の分解とは、密接に関連していることがわかった。また、26Sプロテアソームの活性は、既存のプロテアーゼインヒビターでは、阻害されなかしたことより、既存のプロテアーゼとは、異なる触媒活性部位を持つと推察される。

#### 【0072】実施例6

ラット26Sプロテアソームの蛋白質分解活性に及ぼす影響因子

ラット20Sプロテアソームは、不活性型で細胞内に局在し、SDSやポリL-リシンで活性化され、酸性、塩基性、および中性のアミノ酸を分解することが知られている[Tanaka K. et al., 「J. Bio. Chem.」 261, 15197-15203 (1986)]。しかしながら、26Sプロテアソームの詳細については明らかになっていないため、その蛋白質分解活性に及ぼすSDS濃度、pH、温度の影響を20Sプロテアソームと比較した。

【0073】なお、蛋白質分解活性の測定においては、基質として、合成基質を用い、中性アミノ酸としては、キモトリプシン様基質Suc-LLVY-MCA(ペプ

チド研究所社製)、酸性アミノ酸としては、C b z - L E - N A (シグマ社製)、塩基性アミノ酸としては、トリプシン様基質B o c - L R R - M C A (ペプチド研究所社製)を用いた。

【0074】(1) SDS濃度

図7に、ラット20Sプロテアソームと26Sプロテアソームの蛋白質分解活性に及ぼすSDS添加濃度の効果を示す。20Sプロテアソーム(図7上段)は、S u c - L L V Y - M C A 、C b z - L L E - N A の分解に対しては不活性型であったが、SDS添加により活性化され、最大活性はSDS濃度が0.05%で見られ、0.07%以上では、酵素の変性により失活した。一方、B o c - L R R - M C A の分解は、SDS濃度依存的に阻害された。

【0075】次に、26Sプロテアソーム(図7下段)について調べたところ、S u c - L L V Y - M C A の分解に対してSDSを添加をしなくても活性があることがわかった。さらにこの活性は、SDS濃度0.01%では阻害されたが、それ以上の濃度では、再び活性化され、20Sプロテアソームと同様の挙動を示した。

【0076】これは、26Sプロテアソーム中の20Sプロテアソームが0.01%で解離し、さらにSDSを添加することにより、20Sプロテアソームが活性化されるためと考えられる。C b z - L L E - N A の分解に対しては20Sプロテアソームと同様の挙動を示すが、B o c - L R R - M C A の分解に対しては、SDSによる濃度依存的阻害効果は、大きかった。これらの結果より、20Sプロテアソームは制御因子と結合することにより、26Sプロテアソームを生成し、20Sプロテアソームと異なる蛋白質分解活性を示すことがわかった。

【0077】(2) pHによる影響

図8に、ラット20Sプロテアソーム(図8上段)と26Sプロテアソーム(図8下段)の蛋白質分解活性に及ぼすpHの影響を示す。黒丸は、0.05%SDS添加した際の、また、白丸は無添加の際の蛋白質分解の相対活性を示す。20Sおよび26Sプロテアソームは共に、中性から弱アルカリ性領域に最大活性があった。

【0078】S u c - L L V Y - M C A 分解活性については、両プロテアソーム共に、pH8に最大活性があったが、分解活性のパターンは両プロテアソームでは異なっていた。26SプロテアソームのS u c - L L V Y - M C A 分解活性において、SDSはpH8.0以下では、いくぶん阻害的に作用するが、pH8.0以上では影響しなかった。

【0079】一方、20Sプロテアソームに関しては、広範囲のpHにわたって、SDSは、S u c - L L V Y - M C A 分解活性を上昇させた。C b z - L L E - N A 、B o c - L R R - M C A の分解に対するpHの影響は、両プロテアソーム共にほぼ同様の挙動を示し、この際、SDSはC b z - L L E - N A の分解に対して活性

化に、B o c - L R R - M C A の分解に対しては阻害的に作用した。

【0080】(3) 温度による影響

図9に、ラット20Sプロテアソーム(図9上段)と26Sプロテアソーム(図9下段)の蛋白質分解活性に及ぼす温度の影響を示す。黒丸は0.05%SDSを添加した際の、また白丸は無添加の際の蛋白質分解の相対活性を示す。

【0081】図9上段に示される様に、20Sプロテアソームの蛋白質分解の相対活性は、全て40℃で最大活性があった。一方、図9下段に示される様に、26SプロテアソームのS u c - L L V Y - M C A 分解活性は40℃では不安定であったが、0.05%SDSを添加した際には、50℃に最大活性があった。これに対して、C b z - L L E - N A およびB o c - L R R - M C A の分解に及ぼす温度の影響に関しては、20Sおよび26Sプロテアソームは、ほぼ同様の挙動を示した。これらのことより、S u c - L L V Y - M C A を分解するキモトリプシン様活性に関しては、26Sプロテアソームのほうが、20Sプロテアソームより、安定であることがわかった。

【0082】実施例7

ラット26Sプロテアソームの形状

ヒト26Sプロテアソームを50mg/mlに調製し、1-3%ウラニル酢酸(pH4.5)で支持膜上に逆染色し、電子顕微鏡(日立社製、H7000)で観察した。

【0083】図10に、電子顕微鏡写真を基に描いた26Sプロテアソームの分子構造モデルを示す。図10で示されるように26Sプロテアソームの分子形状はダンベル状で、その中央部には20Sプロテアソームの構造が認められた。

【0084】

【発明の効果】本発明者等の研究によれば、プロテアソームの遺伝子は、肝癌細胞、腎癌細胞、白血病細胞などの悪性腫瘍細胞において正常細胞に比較して異常に高く発現し、さらに、これらの腫瘍細胞の核にプロテアソームが、異常蓄積することが観察されており、本発明の26Sプロテアソームを抗原とする抗体を用いることにより、これらの各種腫瘍をはじめとする各種病態を、通常の免疫測定法により測定し、前記各種病態を診断することが可能である。

【0085】また、多機能プロテアーゼが、前記悪性腫瘍をはじめ、アルツハイマー病等の各種病態と深く関与している重要な因子であるとされていることから、本発明のラット26Sプロテアソームは、そのような各種病態の発現メカニズムの解明と、その有効な治療法を確立する上できわめて有用なものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明ラット26Sプロテアソームのバイオゲ

ルカラムによる精製における溶出パターンを示す。

【図2】本発明ラット26Sプロテアソームのグリセロール密度勾配遠心法による精製における溶出パターンを示す。

【図3】本発明ラット26SプロテアソームのSDS-PAGEによる分析結果を示す。

【図4】本発明ラット26Sプロテアソームの2次元電気泳動による分析結果を示す。

【図5】本発明ラット26Sプロテアソームの未変性状態での電気泳動による分析結果を示す。

【図6】本発明ラット26Sプロテアソームによるユビ

キチン結合蛋白質およびATP分解活性に及ぼすpHおよびATP濃度依存性を示す。

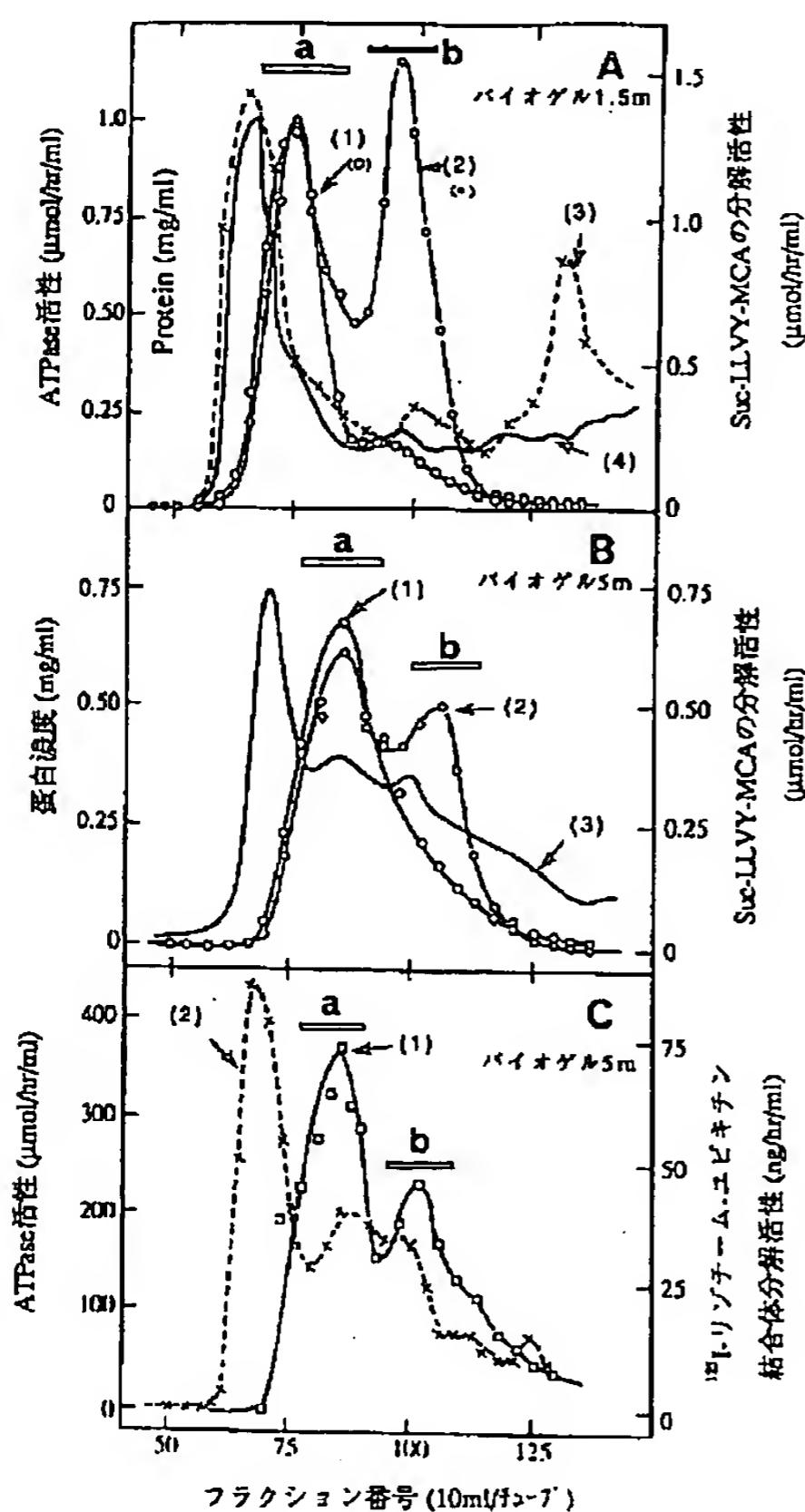
【図7】本発明ラット26Sプロテアソームの蛋白質分解活性のSDS濃度依存性を示す。

【図8】本発明ラット26Sプロテアソームの蛋白質分解活性のpH依存性を示す。

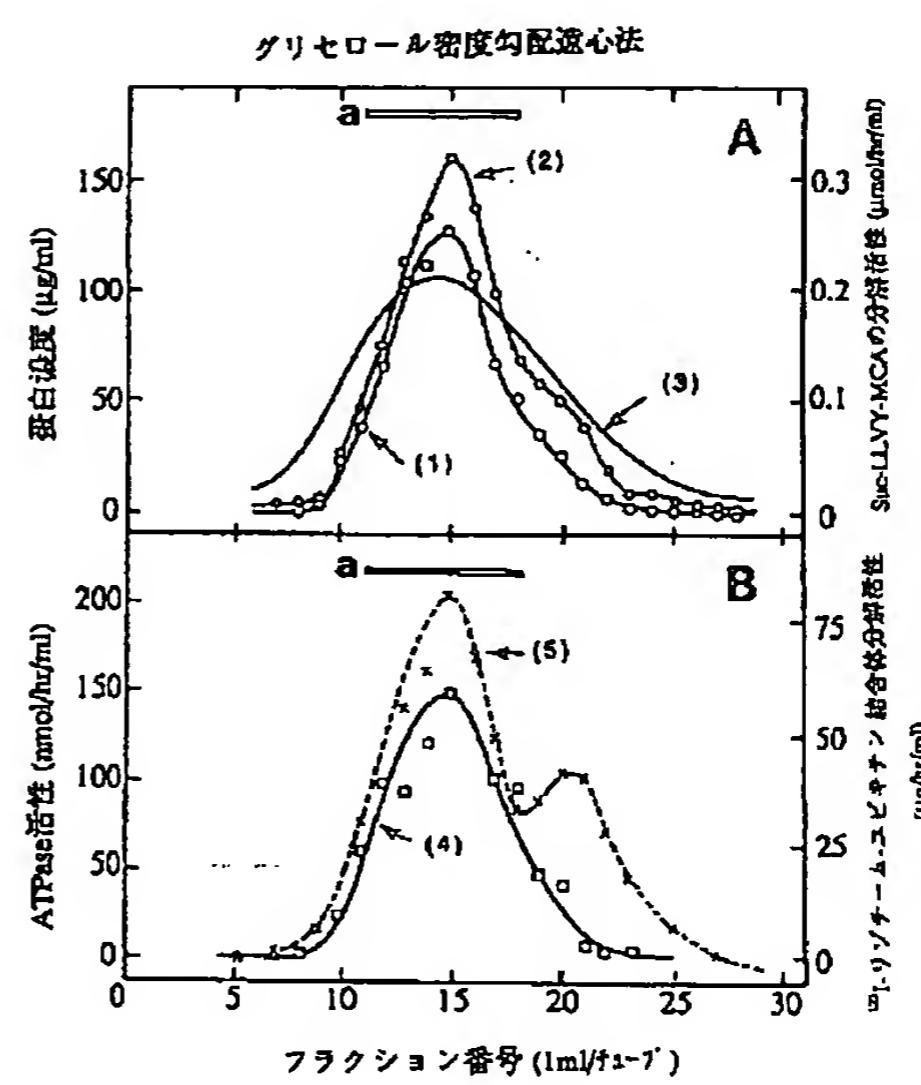
【図9】本発明ラット26Sプロテアソームの蛋白質分解活性の温度依存性を示す。

【図10】本発明ラット26Sプロテアソームの形状を電子顕微鏡写真を基に作製した分子構造モデルを示す。

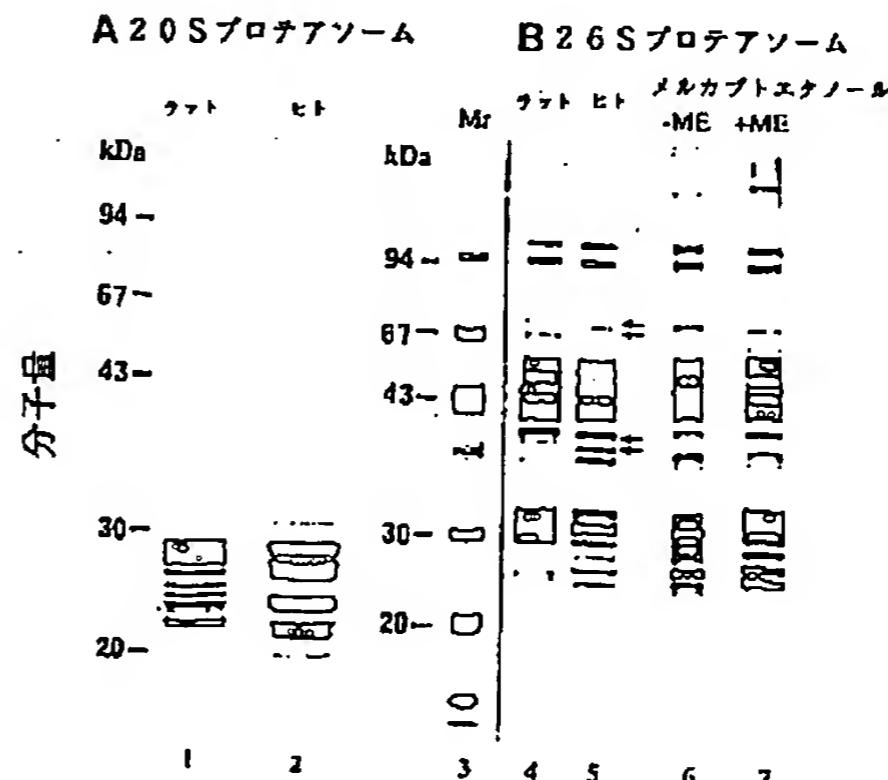
【図1】



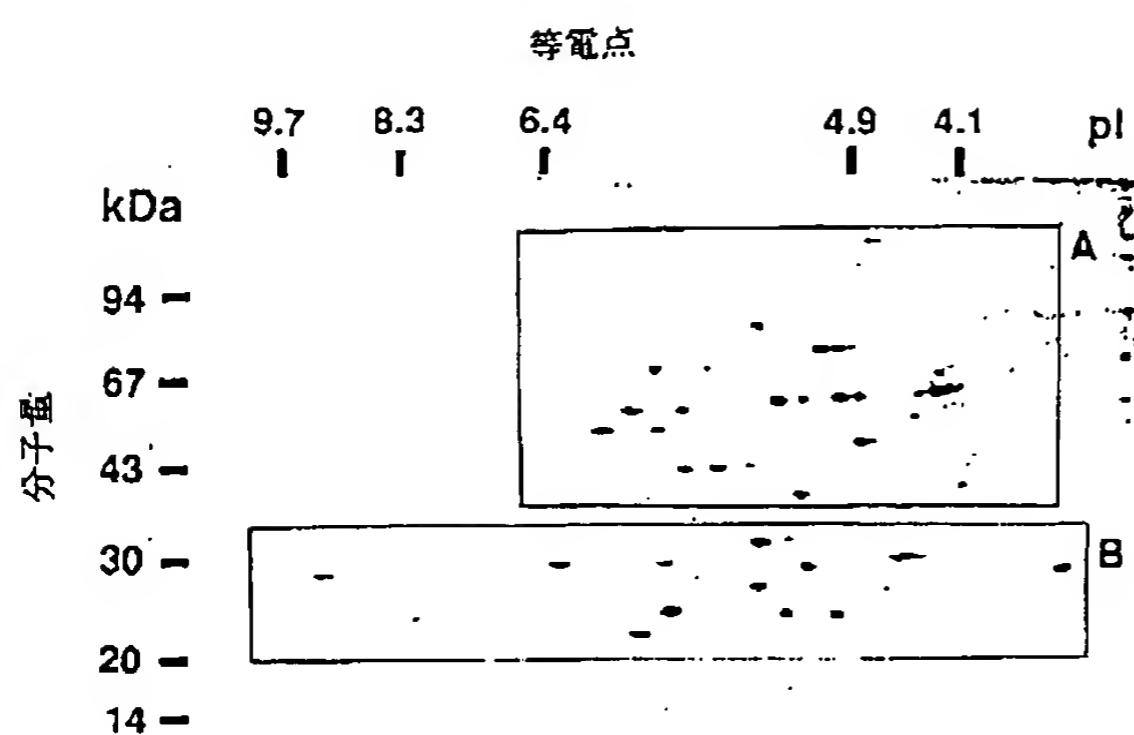
【図2】



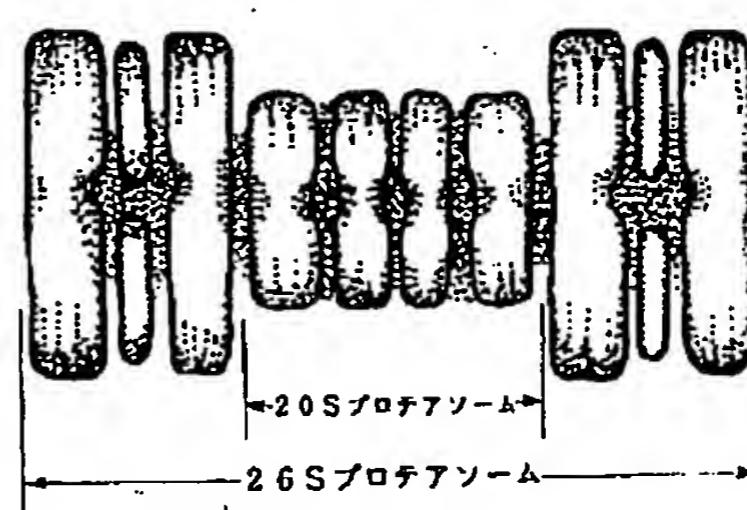
【図3】



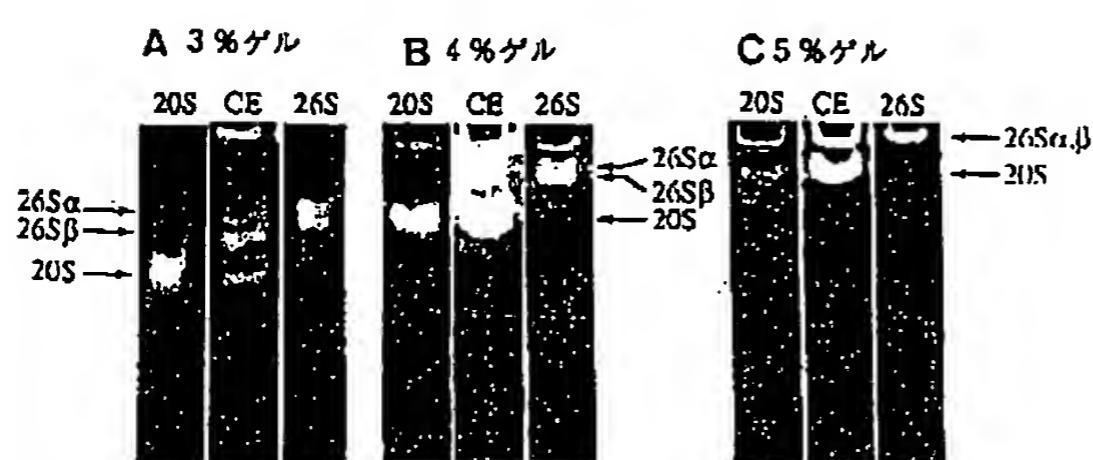
【図4】



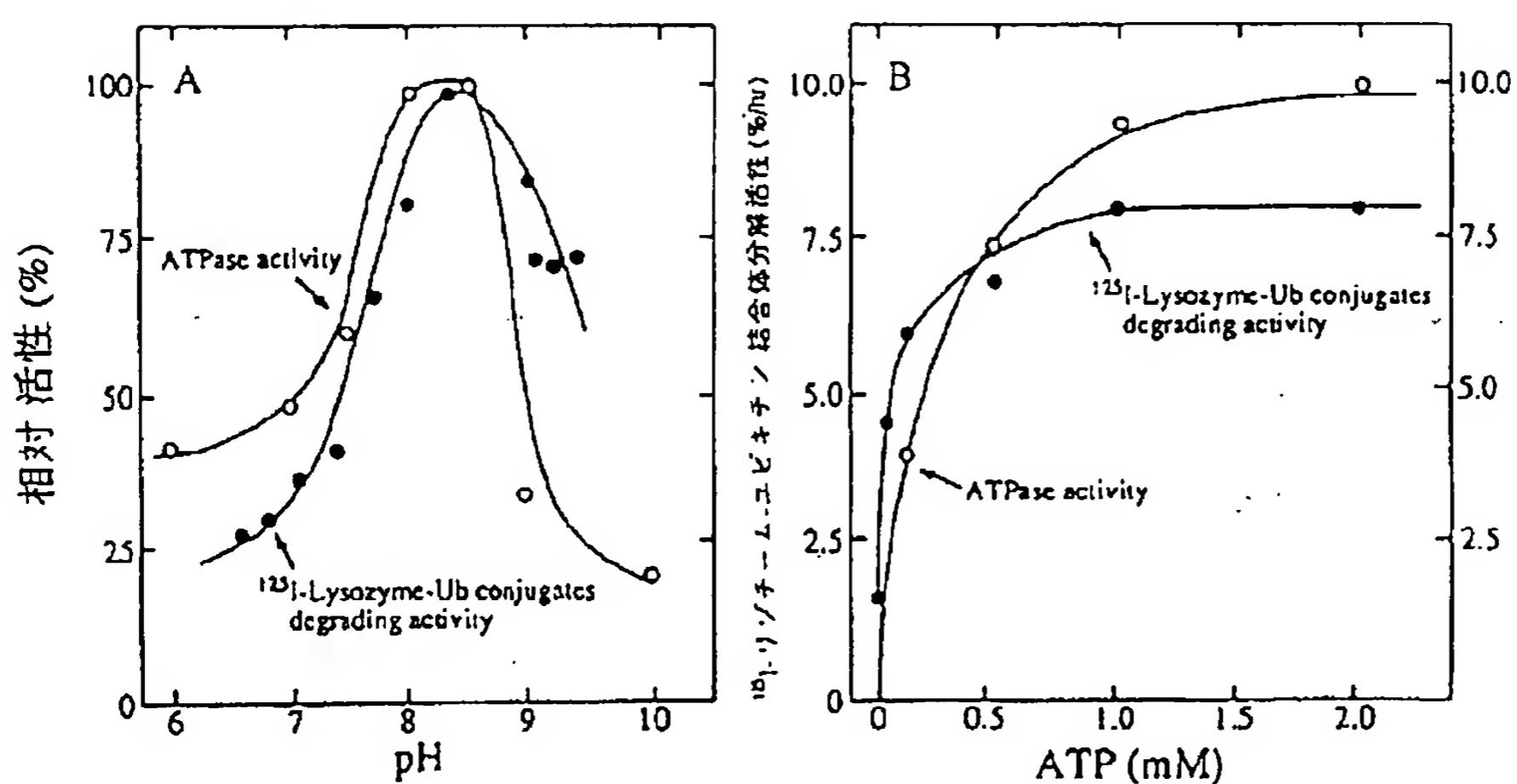
【図10】



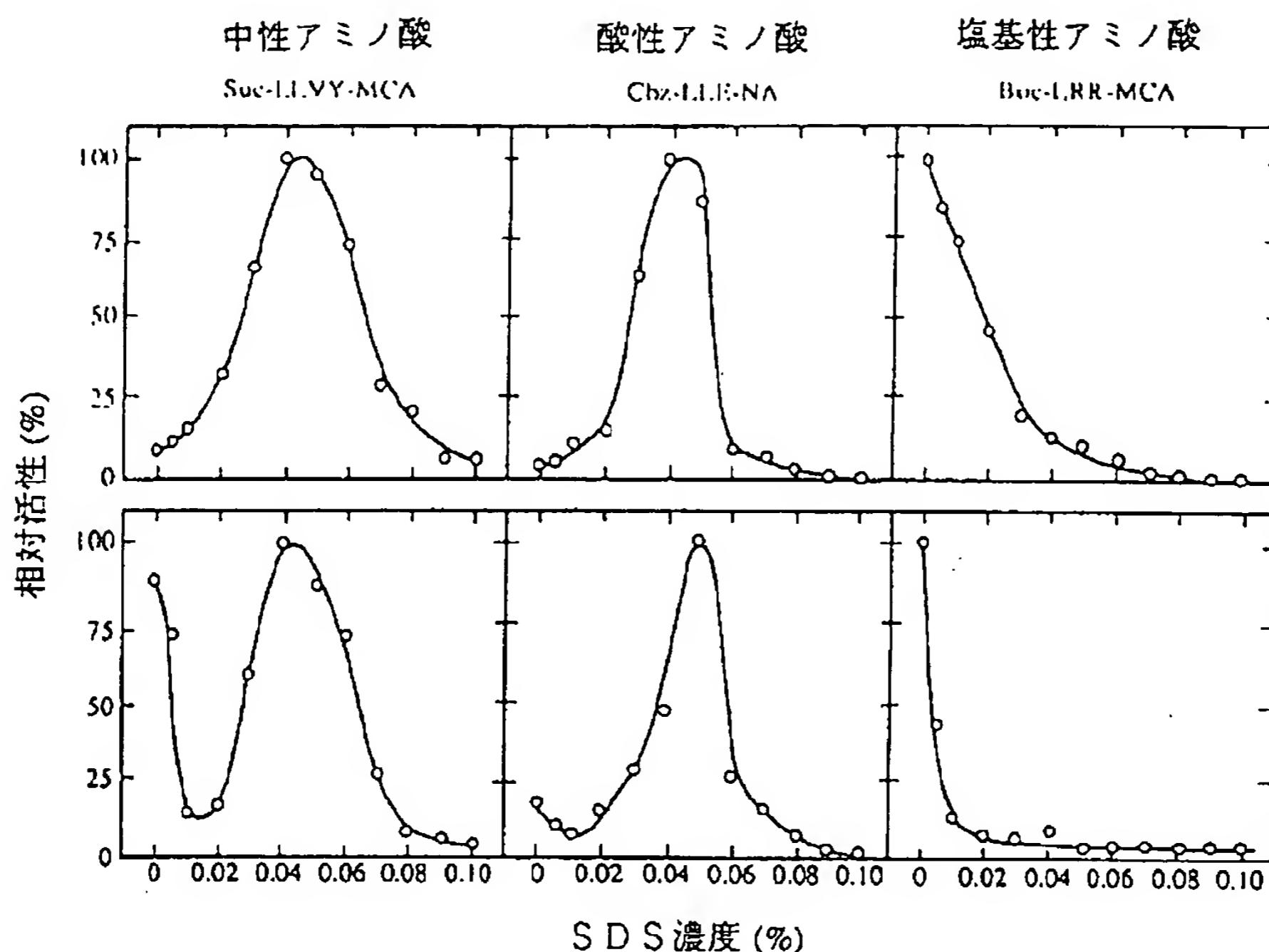
【図5】



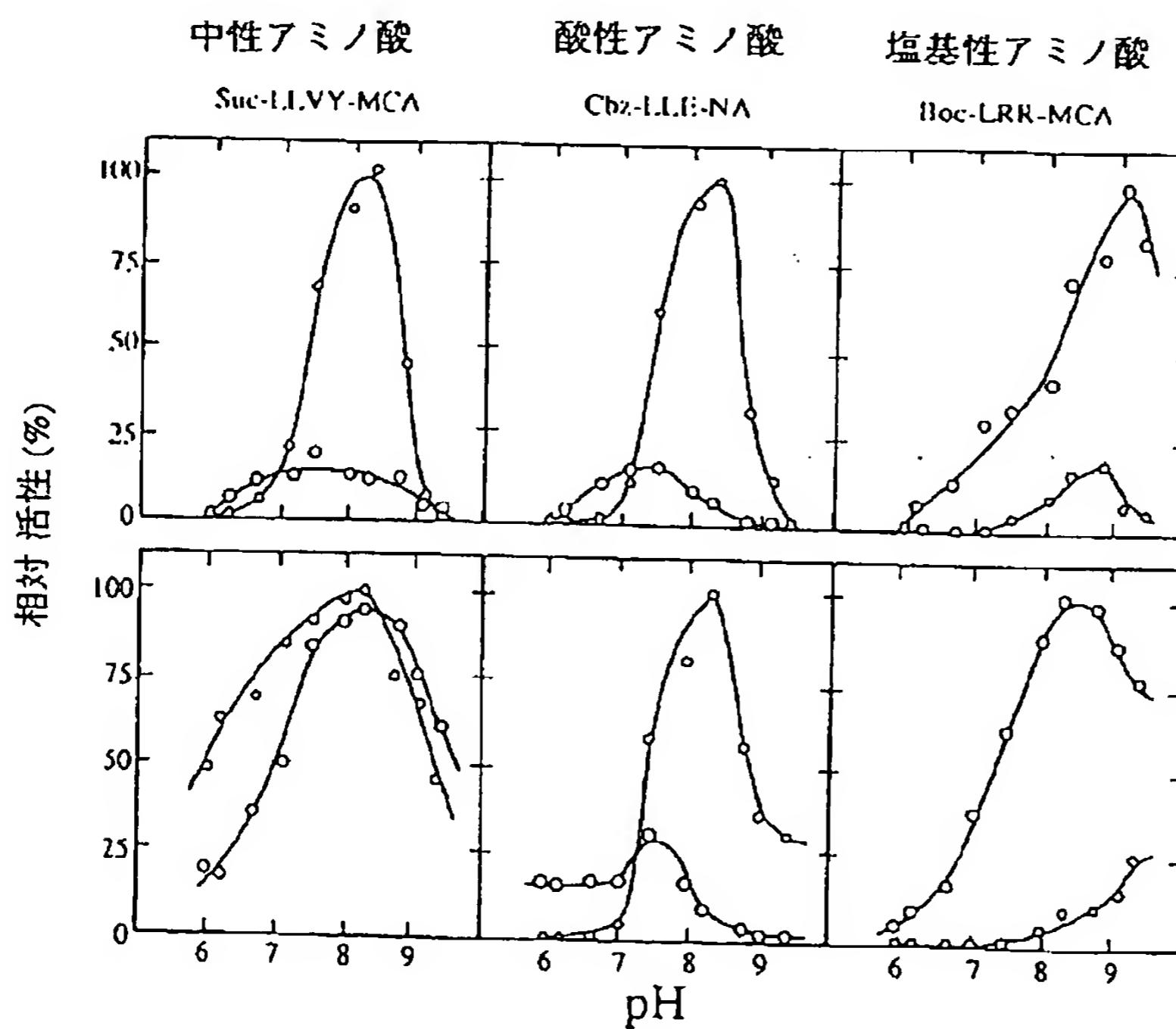
【図6】



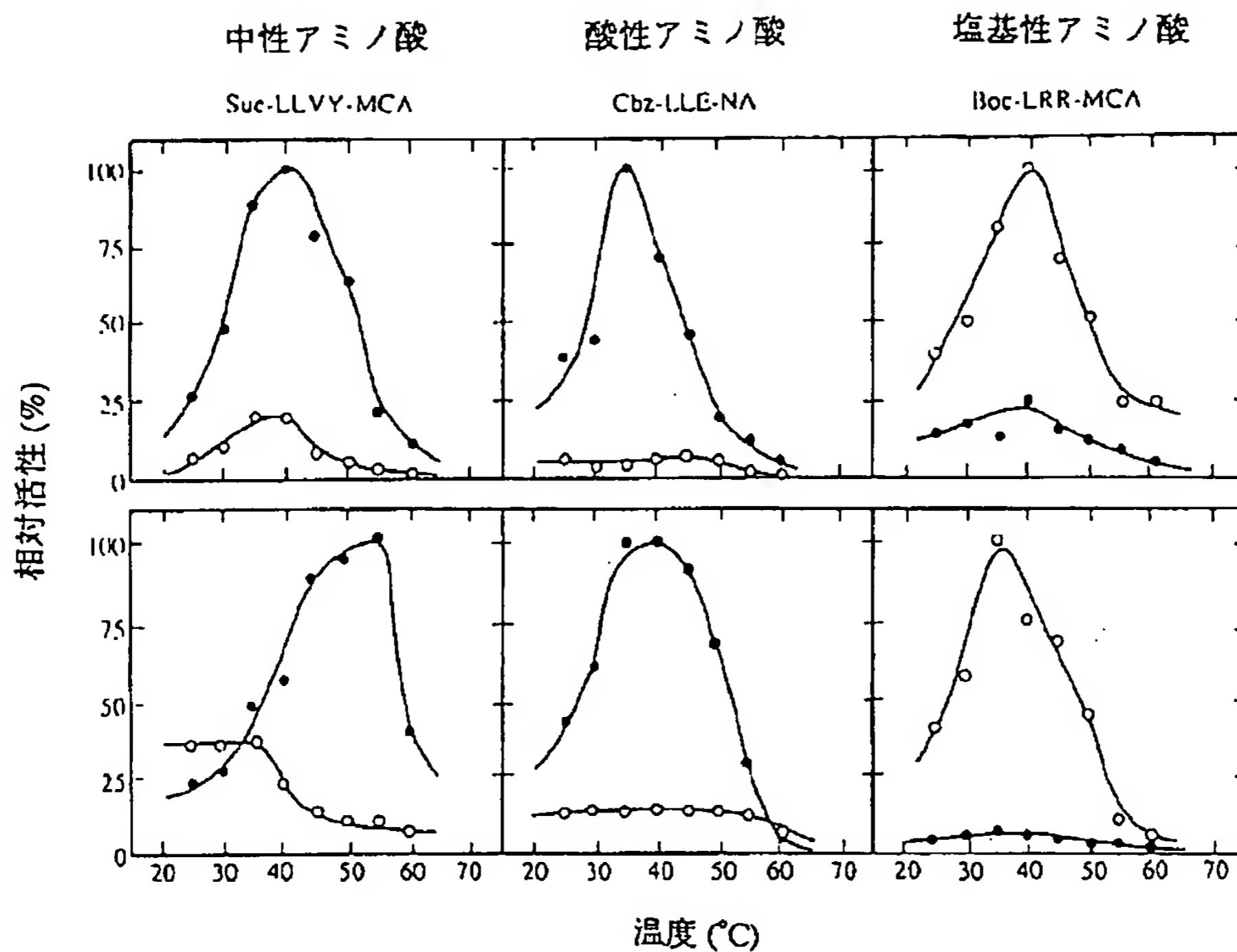
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>  
G 01 N 33/574識別記号  
A 9015-2J

F I

技術表示箇所